

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI LIGNIN DARI BEBERAPA SUBSTRAT ALAMI

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LIGNIN DEGRADING BACTERIA FROM SEVERAL NATURAL SUBSTRATES

Erni Martani¹, Nur Haedar², dan Sebastian Margino³

ABSTRACT

Pulp and paper mill effluent contain of black liquor with high concentration of lignin. Biological treatment of this effluent could be done by inoculation of lignin degrading microorganisms. The objective of this study was to obtain bacterial isolates able to degrade lignin. Several kind s of natural substances containing lignin were used as the source of isolates. Isolation was done using plating method in specific agar medium. Lignin degrading bacterial colonies was indicated by formation of brown color around the colony. Quantitative selection of lignin degradation ability was based on specific enzymatic activity and degradation of lignin containing in black liquor. Examination of their lignin degradation activity was conducted using several concentration of black liquor as the sole of carbon source. The selected isolate were identified until genus level. Five teen strains of lignin degrading bacteria were isolated from the sample materials. Based on the ratio between diameter of brown color and diameter of bacterial colony, six strains of bacteria that were isolated from domestic solid waste and decomposed wood, were chosen and examined quantitatively their ability to degrade lignin. The data showed that two bacterial isolates (coded as SPH-9 and SPH-10) were able to produce vanillin much higher then the other, i.e. 2994.93 and 2991.27 g/ml, with specific enzyme activity 0.55 and 0.56 unit/mg protein, respectively. Lignin degradation showed that within 14 days incubation period by using black liquor as the sole of carbon source indicated that SPH-9 and SPH-10 able to degrade lignin around 23 to 76% depend on black liquor concentration. Maximal degradation of lignin was in black liquor concentration of 10%. Bacterial identification showed that SPH-9 and SPH-10 was the member of *Micrococcus* and *Bacillus*, respectively.

Key words: bacteria, lignin, degradation

PENGANTAR

Kebutuhan kertas makin meningkat dalam satu dekade terakhir ini, yang pada gilirannya memacu peningkatan kebutuhan pulp (bubur kertas) sebagai bahan baku dalam pembuatan kertas. Hal ini mendorong makin banyaknya industri pulp dan kertas, baik di Pulau Jawa maupun di luar Pulau Jawa. Dampak negatif akibat maraknya industri pulp dan kertas adalah pencemaran lingkungan yang ditimbulkan oleh limbah industri tersebut. Salah satu bentuk limbah cair industri pulp adalah lindi hitam (*black liquor*) yang dihasilkan selama proses delignifikasi.

Lindi hitam merupakan limbah yang dikeluarkan dari proses delignifikasi, yaitu proses pemisahan secara kimiawi komponen lignin kayu dari selulosa sebagai penyusun utama pulp. Kebanyakan industri pulp menjalankan proses delignifikasi dengan penambahan asam sulfat (sulfitasi) pada suhu tinggi, dan lignin terpisah dari komponen selulosa berbentuk ligno-sulfat dalam cairan lindi hitam. Komponen utama lindi hitam berupa lignin yang berbentuk ligno-sulfat (Fengel and Wegener, 1995). Keberadaan lindi hitam di dalam limbah cair

¹ Staf Pengajar Program Studi Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

² Staf Pengajar Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Hasanudin, Ujung Pandang

³ Guru Besar Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

menyebabkan limbah tersebut berwarna coklat gelap kehitaman. Warna coklat gelap tersebut merupakan akibat tingginya kandungan lignin yang tidak teroksidasi sempurna (Hernandes *et al.*, 1994). Fengel and Wegener (1995) melaporkan bahwa degradasi tidak sempurna komponen lignin, yang berupa gugus khromofor dan leukokhromofor, seperti koniferil aldehid, sinapil aldehid, dan kuinon, menyebabkan limbah berwarna gelap.

Beberapa pustaka melaporkan bahwa penanganan limbah cair industri pulp dan kertas dapat dilakukan dengan memanfaatkan aktivitas mikrobial pendegradasi lignin dan komponen penyusunnya. Mikrobial tersebut mampu mempercepat degradasi lignin yang terkandung dalam limbah cair tersebut (Martani *et al.*, 1999; Samejima *et al.*, 1990; Springer, 1986; Vicuna *et al.*, 1990), sehingga dapat mengurangi intensitas warna gelap limbah; atau yang dikenal dengan istilah dekolorisasi.

Lignin merupakan polimer tiga dimensi yang terdiri atas berbagai asam-asam fenolat seperti misalnya dihidroksi asam benzoat, kumaril alkohol, dan asam ferulat sebagai monomernya. Karena struktur kimianya yang kompleks, lignin sangat sulit didegradasi dan hanya beberapa jenis mikrobial tertentu saja yang mampu mendegradasi senyawa ini.

Golongan mikrobial eukariotik, antara lain kelompok jamur sudah lama diteliti di tingkat laboratorium dalam upaya meningkatkan degradasi limbah yang mengandung lignin. Sebagai salah satu contohnya adalah jamur pembusuk putih (*White rot fungi*), seperti beberapa anggota genus *Coriolus* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, dan *P. sordida* (Martani *et al.*, 1999), serta jamur *Rhizopus oryzae* (Nagarathnamma and Bajpai, 1999). Untuk dapat digunakan dalam sistem penanganan limbah pulp, aplikasi jamur menemui beberapa kendala, terutama terkait dengan ketidaksesuaian antara nilai pH limbah dengan kisaran pH optimal pertumbuhan jamur (Martani dan Margino, 1998; Martani *et al.*, 1999). Pada dasarnya limbah cair pulp memiliki pH basis (di atas 10); di sisi lain, kebanyakan jamur, termasuk jamur pembusuk putih, tumbuh optimal pada pH masam. Oleh karena itu, aplikasi mikrobial ini memerlukan konsekuensi penambahan larutan asam atau senyawa sejenisnya untuk menurunkan pH hingga tingkat yang dapat ditolerir jamur, yaitu sekitar 4 – 5 (Martani *et al.*, 1999). Dalam tingkat industri, penambahan senyawa asam ini jelas merupakan kendala yang mempunyai implikasi besar di bidang ekonomi.

Degradasi lignin tidak saja dapat dilakukan oleh mikrobial dari golongan jamur, melainkan juga dapat didegradasi oleh beberapa anggota mikrobial prokariotik seperti bakteri dan aktinomisetes. Sebagai contoh adalah bakteri dari genus *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* ataupun *Streptomyces* (Ball *et al.*, 1989; Crawford, 1981; Hernandez *et al.*, 1994; Vicuna *et al.*, 1990). Banyak bakteri yang memiliki nilai pH optimal sekitar netral ataupun cenderung basis. Sehingga dimungkinkan aplikasi bakteri dalam penanganan limbah cair pulp dapat mengurangi biaya yang harus dikeluarkan untuk menurunkan pH limbah seperti halnya pemakaian inokulum jamur.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh isolat-isolat bakteri yang mampu mendegradasi lignin, terutama lignin yang terdapat dalam lindi hitam. Bakteri pendegradasi lignin diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai alternatif pengganti mikrobial eukariotik pendegradasi lignin dalam sistem penanganan limbah cair dalam industri pulp dan kertas.

CARA PENELITIAN

Sumber isolat

Beberapa jenis sumber isolat dipergunakan dalam penelitian ini. Sumber isolat merupakan bahan ataupun substrat alami yang banyak mengandung lignin atau yang sedang mengalami proses dekomposisi bahan organik, khususnya lignin. Sumber isolat terdiri atas : lindi hitam,

tanah gambut, kompos, kayu lapuk dan sampah. Masing-masing sumber isolat sebesar 11 gram disuspensikan dalam 99 ml aquadest steril untuk memperoleh konsentrasi 10^{-1} , dan kemudian diencerkan menggunakan aquadest steril hingga diperoleh suatu seri pengenceran. Suspensi yang telah diencerkan ini digunakan sebagai sumber isolat bakteri pendegradasi lignin.

Isolasi bakteri pendegradasi lignin

Bakteri pendegradasi lignin diisolasi dari beberapa jenis sumber isolat yang telah disiapkan. Isolasi dilakukan menggunakan metoda *surface plating* di atas medium nutrisi agar yang dimodifikasi (komposisi 50% dari standar) dan mengandung asam tanat 1,0% (Rao, 1982). Pembentukan zone berwarna coklat di sekitar koloni bakteri merupakan indikasi bahwa koloni tersebut mampu mendegradasi lignin. Hanya koloni-koloni inilah yang kemudian diisolasi dan ditumbuhkan dalam medium agar.

Seleksi bakteri pendegradasi lignin secara kualitatif

Isolat bakteri pendegradasi lignin yang diperoleh kemudian diseleksi kemampuan degradasi ligninnya secara kualitatif; yaitu didasarkan atas luasnya pembentukan zone warna coklat. Masing-masing isolat diinokulasikan dengan metode titik di atas medium nutrisi agar yang dimodifikasi dan mengandung asam tanat 1,0% (Rao, 1982). Setelah diinkubasikan, diamati zone warna coklat yang terbentuk di sekitar koloni. Berdasar atas rasio antara diameter zone coklat dengan diameter koloni, serta intensitas warna coklat yang terbentuk, dipilih beberapa koloni unggul. Koloni-koloni unggul ini sajalah yang dipilih untuk diperlakukan pada percobaan berikutnya, yaitu seleksi kuantitatif.

Seleksi aktivitas lignolitik secara kuantitatif

Seleksi ini didasarkan atas besarnya aktivitas enzim spesifik (aktivitas enzim dalam unit/mg protein), untuk menentukan aktivitas enzim lignolitik (jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan vanilin per ml lignin per menit, dengan satuan unit) bagi masing-masing isolat. Metode yang digunakan merupakan modifikasi metode Kawakami (1980) dan Samingan (1998). Ekstrak enzim kasar diperoleh dengan inokulasi kultur bakteri isolat (10% v/v) ke dalam medium minimal yang mengandung lignin alkali (Aldrich), dan diinkubasikan pada suhu 30°C di atas penggojok selama 24 jam. Pada akhir inkubasi kultur disentrifus pada kecepatan 5000 rpm bersuhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar, yang digunakan sebagai inokulum untuk degradasi lignin dalam larutan buffer fosfat (pH 7) dengan menggunakan substrat lignin alkali.

Kadar vanillin ditera menggunakan spektrofotometer uv pada panjang gelombang 335 nm; sedangkan kadar enzim ditentukan berdasar kadar protein terlarut dengan metode Lowry.

Pengujian degradasi lignin dalam lindi hitam

Isolat bakteri unggul diuji kemampuan mereka dalam mendegradasi lignin yang terkandung dalam lindi hitam. Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing isolat ke dalam medium garam mineral (Kerr *et al.*, 1983) yang ditambah dengan lindi hitam pada konsentrasi akhir antara 0 – 50% (v/v) sebagai satu-satunya sumber karbon. Kultur diinkubasikan dalam suhu kamar di atas penggojok pada kecepatan 125 rpm selama 14 hari. Secara periodik konsentrasi lignin sisa dalam medium diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 700 nm setelah sebelumnya diekstraksi terlebih dahulu menggunakan metode Rao (1982).

Karakterisasi bakteri terseleksi dalam mendegradasi lignin

Karakterisasi dilakukan berdasar atas pengamatan terhadap sifat-sifat morfologi koloni, morfologi sel dan beberapa sifat biokimiawi (Holt *et al.*, 1994) pada masing-masing isolat unggul dalam mendegradasi lignin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi bakteri pendegradasi lignin

Beberapa jenis sumber isolat yang digunakan yaitu berupa bahan yang mengandung lignin ataupun jaringan berkayu yang membusuk. Diperkirakan dalam masing-masing bahan tersebut terkandung mikrobia khususnya bakteri yang mampu mendegradasi lignin. Masing-masing jenis sumber dan jumlah isolat yang diperoleh dapat dilihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah isolat bakteri pendegradasi lignin dari beberapa substrat alami.

No	Sumber isolat	Asal sumber isolat	Kode isolat	Jumlah isolat
1	Lindi hitam	Industri pulp di Riau	--	0
2	Tanah gambut	Kalimantan Tengah	--	0
3	Kompos	Pasaran bebas di D.I. Yogyakarta	--	0
4	Kayu lapuk	Daerah Jetis, D.I. Yogyakarta	KLJ	5
5	Kayu lapuk	Daerah Sleman, D.I. Yogyakarta	KLS	1
6	Sampah domestik	D.I. Yogyakarta	SPH	15
Total isolat				21

Tabel 1 menunjukkan bahwa isolat bakteri pendegradasi lignin hanya dapat dijumpai di beberapa jenis sumber saja, yaitu kayu lapuk dan sampah domestik. Sedangkan dalam lindi hitam, tanah gambut dan kompos tidak dapat diisolasi bakteri pendegradasi lignin. Dalam kayu yang sedang mengalami pelapukan (kayu lapuk) terjadi proses dekomposisi bahan organik, termasuk degradasi lignin sebagai komponen utama kayu. Proses biokimiawi yang mirip juga terjadi dalam sampah, dimana mikrobia heterotrof melakukan dekomposisi bahan organik, terutama selulosa dan hemiselulosa. Sebagai bahan organik yang memiliki struktur kimia paling kompleks dan resisten, lignin didegradasi terakhir, yaitu setelah senyawa-senyawa organik sederhana telah habis atau berkurang. Oleh karena itu, dalam kedua jenis sumber isolat ini ditemukan isolat bakteri pendegradasi lignin masing-masing sebanyak 5, 1 dan 15 dari kayu lapuk asal Jetis, asal Sleman, dan sampah domestik di D.I. Yogyakarta (Tabel 1).

Meskipun telah dilakukan isolasi beberapa kali, tidak berhasil ditemukan bakteri lignolitik dalam lindi hitam murni. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pH lindi hitam tersebut sekitar 11,40 (Tabel 4); sehingga hanya mikrobia yang bersifat basofil kuat saja yang dapat hidup di lingkungan tersebut. Selain itu, sampel lindi hitam tersebut merupakan lindi hitam murni yang diperoleh langsung dari proses delignifikasi dengan konsentrasi lignin 17,77 mg/ml (Tabel 4). Konsentrasi lignin tinggi ini jelas merupakan kondisi lingkungan yang tidak mendukung pertumbuhan mikrobia.

Tanah gambut Kalimantan mengandung lignin dalam jumlah tinggi, sehingga diharapkan dalam tanah tersebut terkandung mikrobia pendegradasi lignin. Namun, dalam studi ini, dalam tanah tersebut, juga tidak berhasil diisolasi bakteri pendegradasi lignin (Tabel 1). Fenomena ini mungkin disebabkan oleh nilai pH gambut yang di bawah 4. Kebanyakan bakteri tumbuh optimal pada kisaran pH netral atau sedikit basa (Alexander, 1993). Selain itu, tanah gambut mengandung berbagai jenis asam fenolat yang merupakan hasil degradasi lignin (Sabiham *et*

et al., 1997). Dalam studi pendahuluan yang tidak dipublikasikan, ditunjukkan bahwa beberapa asam fenolat bersifat toksik terhadap mikrobia, terutama golongan prokariotik.

Sedangkan tidak ditemukannya bakteri pendegradasi lignin dalam kompos kemungkinan disebabkan karena kandungan utama kompos adalah selulosa dan hemiselulosa maupun hasil dekomposisinya. Kompos yang digunakan adalah kompos matang yang dapat diperoleh di pasaran bebas, sehingga tidak diketahui secara detail bahan mentah dalam pembuatan kompos tersebut. Pada awalnya diharapkan dalam kompos akan dapat diisolasi pendegradasi lignin, namun mungkin besar karena kompos tersebut bahan mentahnya berupa tumbuhan dengan kandungan lignin rendah (misalnya jerami atau sisa tumbuhan tak berkayu). Oleh karena itu, dalam penelitian ini tidak berhasil diperoleh isolat bakteri pendegradasi lignin dari kompos.

Ke 21 isolat bakteri pendegradasi lignin di atas dipelihara dan ditumbuhkan dalam medium agar. Seleksi awal ke 21 isolat tersebut didasarkan atas aktivitas lignolitik secara semi-kuantitatif menggunakan inokulasi titik (*point inoculation*) di atas medium NA modifikasi ditambah dengan asam tanat. Dengan tolok ukur warna coklat dan perbandingan diameter zone coklat dengan diameter koloni bakteri, ditentukan isolat unggul yang akan digunakan dalam penelitian tahap selanjutnya.

Dalam Tabel 2 ditunjukkan hasil seleksi semi-kuantitatif bakteri pendegradasi lignin dalam medium nutrient agar dimodifikasi yang mengandung asam tanat. Seleksi didasarkan atas besarnya rasio aktivitas lignolitik, yang merupakan perbandingan antara diameter zone coklat dengan diameter koloni bakteri. Makin besar rasio makin besar pula aktivitas lignolitik yang dimiliki isolat terkait. Rao (1982) membagi kelas jamur lignolitik berdasar atas warna coklat yang terbentuk dan selisih antara diameter zone coklat dengan diameter plug koloni jamur. Namun, belum ada penggolongan khusus untuk bakteri. Oleh karena itu, untuk seleksi bakteri pendegradasi lignin digunakan parameter standar yang biasa digunakan dalam hal ini, yaitu berdasar antara ratio antara diameter zone coklat dengan diameter koloni bakteri.

Terkait dengan kemiripan struktur kimia antara asam tanat dan lignin, beberapa enzim yang berperan dalam degradasi asam tanat juga diperlukan dalam degradasi lignin (Rao, 1982). Oleh karena itu, mikrobia yang mampu mendegradasi asam tanat dimungkinkan juga dapat mendegradasi lignin. Perbedaan intensitas (derajat) warna coklat dan waktu pembentukan zone coklat diperkirakan juga menggambarkan tinggi-rendahnya aktivitas mikrobia dalam mendegradasi asam tanat, yang juga mencerminkan aktivitas degradasi lignin (Alfrida, 1997; Samingan, 1998). Oleh karena itu, intensitas warna coklat dan rasio antara diameter zone dengan diameter koloni digunakan sebagai kriteria penentuan seleksi aktivitas lignolitik isolat bakteri.

Warna zone tidak selalu menggambarkan besarnya aktivitas lignolitik. Tabel 2 menunjukkan bahwa sebagian data memberikan ketidak sesuaian antara besar rasio aktivitas lignolitik yang terbentuk dengan warna zone. Misalnya isolat KLJ-4 yang memiliki rasio 4,14 membentuk warna coklat tua (+ +); tetapi isolat SPH-4, SPH-12 dan SPH-14 yang membentuk warna coklat tua (+ + +) rasio aktivitas lignolitiknya kurang dari 4 (Tabel 2). Oleh karena dalam penelitian ini, seleksi didasarkan atas rasio aktivitas lignolitik; sedangkan warna coklat yang terbentuk sebagai pendukung.

Tabel 2. Aktivitas lignolitik semi-kuantitatif isolat bakteri pendegradasi lignin.

No.	Kode isolat	Warna zone *)	Diameter zone (mm)	Diameter koloni (mm)	Rasio aktivitas
1	KLJ-1	+	22,0	6,0	3,67
2	KLJ-2	++	20,0	5,1	3,93
3	KLJ-3	++	14,5	5,0	2,90
4	KLJ-4	++	14,5	3,5	4,14
5	KLJ-5	++	20,0	7,0	2,86
6	KLS-1	+	15,5	4,5	3,44
7	SPH-1	++	8,5	3,5	2,43
8	SPH-2	+	13,0	4,5	2,89
9	SPH-3	+	6,5	3,0	2,17
10	SPH-4	+++	10,5	3,5	3,00
11	SPH-5	++	8,5	3,0	2,83
12	SPH-6	+++	10,0	3,0	3,33
13	SPH-7	+++	8,0	4,0	2,00
14	SPH-8	+++	9,0	4,5	2,00
15	SPH-9	+++	28,5	5,0	5,70
16	SPH-10	+++	25,5	4,0	6,38
17	SPH-11	+++	15,0	3,5	4,29
18	SPH-12	+++	11,5	3,0	3,83
19	SPH-13	+++	18,5	4,0	4,63
20	SPH-14	+++	17,5	4,5	3,89
21	SPH-15	+++	17,5	4,0	4,39

Catatan : + = warna coklat muda; ++ = coklat tua; +++ = coklat tua kehitaman.

Dalam Tabel 2, dapat diketahui beberapa strain bersifat unggul dibandingkan isolat-isolat lainnya, baik dalam rasio aktivitas lignolitik yang di atas empat, maupun membentuk warna coklat tua / kehitaman. Isolat-isolat unggul tersebut adalah KLJ-4; SPH-9; SPH-10; SPH-11; SPH-13 dan SPH-15. Masing-masing memiliki rasio lignolitik sebesar 4,14; 5,70; 6,38; 4,29; 4,63 dan 4,39; dengan warna zone coklat tua sampai coklat tua kehitaman. Isolat unggul inilah yang dipilih untuk percobaan selanjutnya.

Keenam isolat unggul diuji kemampuannya mendegradasi lignin secara kuantitatif. Analisis didasarkan atas jumlah asam vanilat yang dibentuk dari substrat lignin sintetik setelah waktu inkubasi tertentu. Jumlah sel bakteri hasil metabolisme lignin ditentukan dengan menghitung protein yang terbentuk, sehingga dapat ditentukan juga aktivitas enzim lignolitik masing-masing isolat unggul (Kawakami, 1980; Samangan, 1998). Hasil yang diperoleh ditunjukkan dalam Tabel 3.

Hasil analisis kuantitatif enzim lignolitik menunjukkan adanya korelasi positif dengan analisis kualitatif yang didasarkan atas kemampuannya mendegradasi asam tanat. Secara kualitatif, isolat SPH-9 dan SPH-10 merupakan isolat terbaik dibandingkan lainnya, karena mampu membentuk warna coklat tua kehitaman dengan rasio aktivitas 5,70 dan 6,38 (Tabel 2). Sedangkan secara kuantitatif kedua isolat tersebut juga menunjukkan aktivitas lignolitik tertinggi dengan menyintesis vanillin sebanyak 2,95 dan 2,99; serta mempunyai aktivitas spesifik 0,56 dan 0,57 (Tabel 3).

Tabel 3. Aktivitas spesifik enam isolat lignolitik unggul.

No.	Kode isolat	Vanillin (mg/ml)	Protein (mg/ml)	Aktivitas enzim (unit)	Aktivitas spesifik (unit/mg protein)
1	KLJ-4	2,65	0,58	0,29	0,50
2	SPH-9	2,95	0,58	0,32	0,56
3	SPH-10	2,99	0,58	0,33	0,57
4	SPH-11	2,65	0,55	0,29	0,52
5	SPH-13	2,86	0,58	0,32	0,54
6	SPH-15	2,60	0,55	0,28	0,52

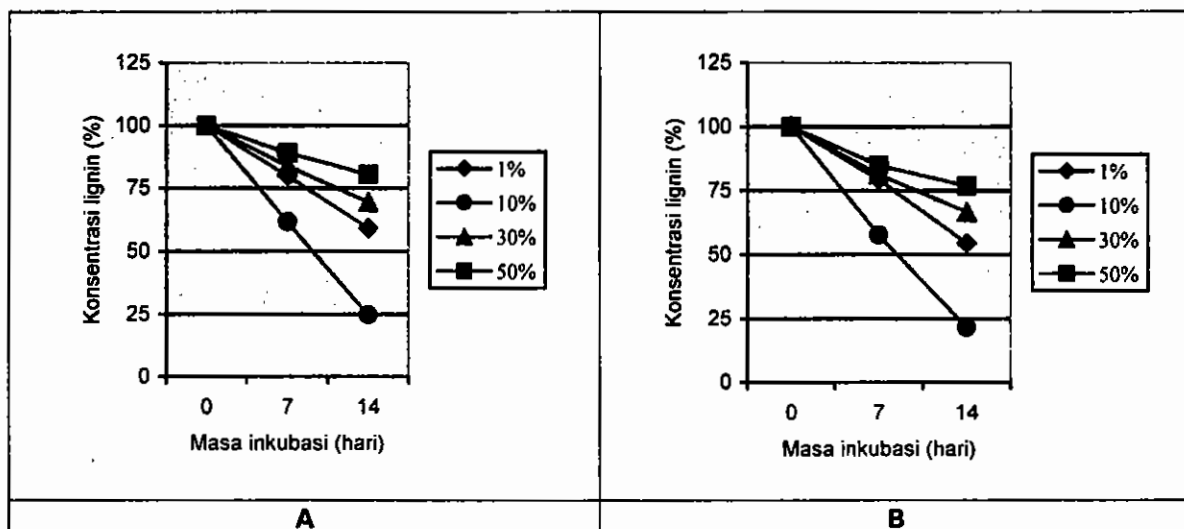
Struktur kimia asam tanat mirip dengan lignin meskipun tingkat kerumitannya lebih rendah. Enzim fenol oksidase merupakan enzim yang bertanggung jawab dalam degradasi asam tanat (Rao, 1982). Dalam degradasi asam tanat tersebut terbentuk warna coklat yang dapat merubah warna medium dalam; uji ini dikenal dengan uji Bavendamm's (Ishihara, 1980). Kelompok enzim tersebut juga berperan dalam proses degradasi lignin, yaitu yang terdiri dari enzim lakase, lignin peroksidase, mangan peroksidase dan tirosinase (Alexander, 1977; Crawford, 1981). Oleh karena itu, dapat dibuktikan bahwa hasil uji lignolitik secara semi-kuantitatif (rasio aktivitas lignolitik) berkorelasi positif dengan uji kuantitatif aktivitas enzimatis.

Tabel 4. Hasil analisis sifat fisika dan kimiawi lindi hitam

Parameter	Nilai
Warna	Coklat kehitaman
pH	11,4
Konsentrasi lignin (mg/ml)	17,77
C-organik (%)	2,35
N- total (%)	0,08
C/N rasio	28,14

Tabel 4 menunjukkan bahwa sampel lindi hitam berwarna coklat kehitaman dengan nilai pH 11,4. Menurut Hernandez *et al.* (1994) warna coklat berasal dari tingginya konsentrasi lignin, terutama lignin yang tidak teroksidasi sempurna. Analisis konsentrasi lignin sample lindi hitam mendukung pernyataan tersebut, dan dalam tabel 4 terlihat bahwa konsentrasi lignin adalah 17,770 mg/ml lindi hitam. Ada kemungkinan, konsentrasi lignin yang sangat tinggi ini dapat mengurangi aktivitas degradasi lignin oleh isolat. Tadano *et al.* (1992) melaporkan bahwa tingginya konsentrasi asam-asam fenolat hasil dekomposisi lignin dapat menghambat pertumbuhan akar tanaman. Martani dkk (2003) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa beberapa asam fenolat hasil degradasi lignin dapat menghambat pertumbuhan mikrobial, terutama mikrobial prokariotik.

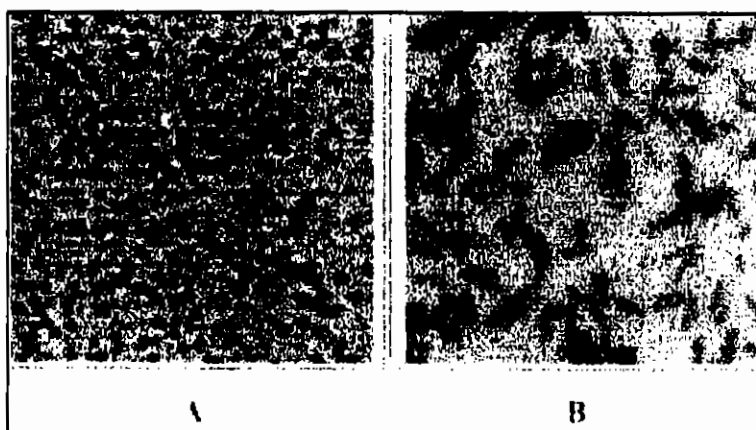
Oleh karena itu, dalam uji degradasi lignin berikutnya, lindi hitam diencerkan sampai beberapa tingkat. Pengenceran ini selain untuk mengurangi toksisitasnya, dimaksudkan juga untuk mengetahui konsentrasi maksimal lindi hitam untuk aktivitas degradasi lignin isolat bakteri. Kedua isolat unggul diinokulasikan dalam medium yang mengandung lindi hitam pada berbagai konsentrasi, yaitu berkisar antara 1% hingga 50% . Hasil pengamatan disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Degradasi lignin dalam lindi hitam pada berbagai konsentrasi oleh isolat SPH-9 (A) dan SPH-10 (B).

Gambar 1 menunjukkan bahwa kedua isolat mampu mendegradasi lignin yang terkandung dalam lindi hitam. Tingginya tingkat degradasi ditentukan oleh konsentrasi awal lindi hitam dalam medium. Untuk memudahkan perbandingan degradasi lignin di antara beberapa konsentrasi awal lindi hitam, digunakan dimensi % lignin yang tersisa. Pada lindi hitam 50%, pada hari ke 14 konsentrasi lignin turun paling lambat, yaitu dari 8850,17 $\mu\text{g/ml}$ menjadi 7003,48 (masih tersisa 80%) ataupun 6881,53 (tersisa 76%), setelah diinokulasi dengan SPH-9 ataupun SPH-10. Penurunan terbesar terjadi pada lindi hitam 10%; yang turun dari 1763,07 $\mu\text{g/ml}$ menjadi 435,54 $\mu\text{g/ml}$ atau 414,63 $\mu\text{g/ml}$. Bila dihitung persentasinya, pada konsentrasi lindi hitam 10% residu lignin setelah 14 hari tersisa sekitar 25% atau 23% pada inokulasi dengan SPH-9 atau SPH-10. Meskipun tidak berbeda secara signifikan, kemampuan isolat SPH-10 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan SPH-9. Kemiripan kedua isolat dalam mendegradasi lignin (Gambar 1) terlihat juga dalam hasil pengamatan degradasi lignin secara kualitatif (Tabel 2) maupun dari aktivitas lignolitik dan aktivitas enzim (Tabel 3).

Perbedaan kemampuan degradasi lignin kedua isolat yang tergantung pada konsentrasi awal lindi hitam (Gambar 1), kemungkinan disebabkan antara lain oleh jumlah senyawa-senyawa yang terbentuk selama degradasi lignin. Dimana semakin tinggi konsentrasi lignin akan dihasilkan jumlah senyawa antara yang semakin besar pula. Degradasi lignin menghasilkan senyawa-senyawa fenolat, baik dalam bentuk p-kumaril alkohol, koniferil alkohol dan sinafil alkohol (Crawford, 1981). Pada konsentrasi tertentu, senyawa-senyawa fenolat ini bersifat toksik terhadap organisme, termasuk tanaman (Todano *et al.*, 1992). Oleh karena itu, akumulasi senyawa-senyawa ini dalam medium dengan lindi hitam konsentrasi tinggi pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas degradasi oleh isolat bakteri terkait.



Gambar 2. Morfologi sel isolat bakteri SPH-9 (A) dan SPH-10 (B)

Kedua isolat unggul di atas, yaitu, bakteri SPH-9 dan SPH-10 diuji karakteristiknya untuk mengetahui identitas / klasifikasinya minimal sampai aras genus. Gambar 2 menunjukkan bentuk sel isolat bakteri SPH-9 dan SPH-10. Sedangkan hasil pengamatan karakter morfologi koloni, sel dan sifat biokimiawinya dapat dilihat dalam Tabel 4. Meskipun memiliki aktivitas lignolitik yang hampir mirip, ternyata kedua isolat mempunyai sifat-sifat morfologi dan biokimiawi yang berbeda, dan masuk dalam anggota genus yang berlainan.

Table 4. Karakteristik isolat bakteri SPH-9 dan SPH-10.

Parameter	SPH-9	SPH-10
Morfologi koloni		
Warna	Putih kecoklatan (krem)	Putih kotor
Bentuk	Sirkuler	Sirkuler
Tepi	Entire	Undulate
Elevasi	Convex	Convex
Struktur dalam	Halus (smooth)	Translucent
Morfologi sel		
Bentuk	Bulat	Batang panjang
Ukuran (μm)	1,4	(0,5 – 1,0) x (1,2 – 2,5)
Endospora	+	+
Reaksi Gram	+	+
Motilitas	--	+
Uji biokimiawi		
Katalase	+	+
Oksidase	--	--
Urease	+	--
Pembentukan indol	--	--
Pembentukan H ₂ S	--	--
Reduksi Nitrat	--	+
Pencairan gelatin	--	+
Hidrolisis pati	+	+
Fermentasi glukosa	+	+
Fermentasi sukrosa	+	+
Fermentasi fruktosa	+	+
Fermentasi laktosa	+	+
Fermentasi maltosa	+	+
Fermentasi galaktosa	+	+
Fermentasi xilosa	+	+
Aerobisitas	Aerob	Aerob
Perkiraan Genus	Micrococcus	Bacillus

Berdasar atas hasil pengamatan makroskopis, mikroskopis dan analisis biokimiawi dengan dibandingkan dengan ciri-ciri beberapa genera bakteri menurut kunci determinasi bakteri dalam Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt *et al.*, 1994), kedua isolat tersebut masing-masing menunjukkan kemiripan dengan genus *Micrococcus* dan *Bacillus*. Besar kemungkinan bahwa kedua isolat SPH-9 dan SPH-10 merupakan salah satu anggota genus *Micrococcus*, yaitu isolat SPH-9; dan SPH-10 masuk dalam genus *Bacillus*. Dalam penelitian ini, kedua isolat bakteri tersebut hanya dapat diidentifikasi sampai dengan aras genus. Untuk memastikan spesies kedua isolat tersebut masih diperlukan beberapa analisis biokimiawi maupun molekuler. Kedua genus ini banyak ditemukan dalam tanah dan air (Holt *et al.*, 1994).

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini, dari kayu lapuk dan sampah dapat diisolasi beberapa strain bakteri yang mampu mendegradasi lignin, yaitu masing-masing 6 dan 15. Sedangkan dari lindi hitam, tanah gambut dan kompos tidak ditemukan isolat bakteri pendegradasi lignin. Berdasar atas seleksi kualitatif maupun kuantitatif isolat bakteri dengan kode SPH-9 dan SPH-10 merupakan isolat yang tertinggi kemampuannya mendegradasi lignin.

Dalam medium garam mineral, degradasi lignin tertinggi pada konsentrasi lindi hitam 10%. Pada konsentrasi ini, selama 14 hari konsentrasi lignin turun dari 1763,07 µg/ml menjadi 435,54 atau 414,63 µg/ml setelah diinokulasi dengan SPH-9 atau SPH-10; yang berarti isolat-isolat tersebut dapat mendegradasi lignin sekitar 75% atau 78%.

Berdasar atas karakteristik sel dan biokimiawinya, isolat SPH-9 diduga merupakan anggota genus *Micrococcus*, dan isolat SPH-10 termasuk dalam genus *Bacillus*.

KEPUSTAKAAN

- Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. 2nd Ed. John Wiley & Sons., New York.
- Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. 2nd Ed. Academic Press. San Diego.
- Alfrida, H. 1999. *Biodegradasi pewarna azo mordant yellow-3 oleh jamur lignolitik*. Tesis S-2. Program Studi Biologi, Jurusan ilmu MIPA. FPS - UGM.
- Ball, A.S., Betts, W.B. and A.J. Mc. Carthy. 1989. Degradation of lignin related Compounds by Actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1642-1644.
- Crawford, R.L. 1981. *Lignin biodegradation and transformation*. John Wiley & Sons. New York.
- Fengel, D. and Wegener, D. 1995. *Kayu: Kimia ultrastruktur reaksi-reaksi*. Diterjemahkan oleh Hardjono Sastroamidjojo. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Hernandez, M., Rondiques, J., Soliveri, J., Copa, J.L., Peres, M.I. and Arias, M.E. 1994. Paper mill effluent decolorization by fifty *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 3909-3913.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th Ed. Williams & Wilkins. USA.

- Ishihara, T. 1980. The role of laccase in lignin biodegradation. In *Lignin biodegradation : Microbiology, chemistry, and potential applications*. Kirk, T.K., T. Higuchi & H. Chang (Eds). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Kawakami, H. 1980. Degradation of lignin related aromatic and lignins by several *Pseudomonas*. In *Lignin biodegradation : Microbiology, chemistry, and potential applications*. Vol 2. Kirk, TK., T. Higuchi & H. Chang (Eds). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Kerr, T.J., Kerr, R.D. and Benner, R. 1983. Isolation of bacterium capable of degrading peanut hull lignin. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 : 1201-1206.
- Martani, E., Marwata, A. and Prijambada, I.D. 1999. Lignin degradation in pulp mill effluent by white rot fungi and the role of urea addition. *Biologi.* 2 : 307-319.
- Martani, E. and Margino, S. 2000. Decolorization of pulp mill effluent and its correlation to lignin degradation. *Biologi.* 2 : 265-276.
- Nagarathnamma, R. and Bajpai. P. 1999. Decolorization and detoxification of extraction-Stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 1078-1082.
- Rao, N.S.S. 1982. *Biofertilizer in agriculture*. Oxford & IBH Publisher Co. New Delhi.
- Sabiham, S., Prasetyo, T.B. and Dohong, S.. 1997. Phenolic acids in Indonesian Peat. In *Biodiversity and Sustainability of Tropical Peatlands*. Rieley, J.O. & Page, S.E. (Eds.). Samara Publishing Limited. UK.
- Samejima, M., Habu, N., Komada, S. and Yoshimoto, T. 1990. Pathway cleavage of Diaryl propane lignin model compound by *Pseudomonas* sp. TMY 1009. In *Biotechnology in pulp and paper manufacturing. Application and fundamental investigation*. Kirk, T.K. & H. Chang. (Eds). Boston.
- Samingan. 1998. *Biodegradasi seresah Acacia mangium Wild oleh jamur lignoselulolitik*. Thesis S-2. Program Studi Biologi, Jurusan ilmu MIPA. FPS – UGM.
- Springer A.M. 1986. Industrial environmental control, Pulp and paper industrial department of paper science and engineering. Miami University. John Wiley & Sons, Inc. Canada.
- Tadano, T., K. Ambak, K. Yonebayashi & W. Pantanahiran. 1992. Occurrence of phenolic compounds and ammonium toxicity in tropical peat soils. In Tan, S.L., Aziz, B. Samy, J., Salmah, Z., Fetimah, S. & Choo, S.T. (Eds). *Tropical Peat*. Proceedings of the International Symposium on Tropical Peatland. Kuching. Malaysia.
- Vicuna, R., Gonzales, B. and Salas, L..1990. Metabolism of lignin-related dimeric Structures by *Pseudomonas fluorescence* biovar 1. In *Biotechnology in pulp and paper manufacturing. Application and fundamental investigation*. Kirk, T.K. & H. Chang. (Eds). Boston.